

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(54) PRODUCTION OF DIHOMO- γ -OLEIC ACID AND LIPID CONTAINING THE SAME

- (11) 5-91887 (A) (43) 16.4.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 3-251964 (22) 30.9.1991
 (71) SUNTORY LTD (72) HIROSHI KAWASHIMA(3)
 (51) Int. Cl.⁵ C12P7/64/(C12P7/64,C12R1/645)(C12P7/64,C12R1/785)(C12P7/64,C12R1/80)(C12P7/64,C12R1/66)

PURPOSE: To easily produce the subject compound in high efficiency exclusively using inexpensive common medium by cultivating a microbial strain capable of producing arachidonic acid and having lowered or depleted $\Delta 5$ -unsaturation activity.

CONSTITUTION: A microbial strain capable of producing arachidonic acid and having lowered or depleted $\Delta 5$ -unsaturation activity (e.g. mutant of *Mortierella alpina* SAM 1860 (FERM BP-3589)) is cultivated to produce the objective compound or a lipid containing the same. The objective compound can be separated from the lipid e.g. by drying the cultivated microbial cells separated from the cultivation liquid, extracting the cell with an organic solvent under nitrogen gas stream, treating the extract with methanol, etc., extracting the treated product with an organic solvent such as hexane to obtain a mixture of fatty acid esters, separating the ester of the objective compound from the mixture by low-temperature crystallization, etc., and hydrolyzing the ester.

(54) PRODUCTION OF ω -9 HIGHLY UNSATURATED FAITY ACID AND LIPID CONTAINING THE SAME

- (11) 5-91888 (A) (43) 16.4.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 3-251966 (22) 30.9.1991
 (71) SUNTORY LTD (72) HIROSHI KAWASHIMA(2)
 (51) Int. Cl.⁵ C12P7/64/(C12P7/64,C12R1/645)(C12P7/64,C12R1/785)(C12P7/64,C12R1/80)(C12P7/64,C12R1/66)

PURPOSE: To obtain the subject compound useful as a precursor for leucotriene 3 group using an inexpensive common medium in high efficiency by cultivating a microbial strain capable of producing ω -type highly unsaturated fatty acid.

CONSTITUTION: A microbial strain capable of producing ω -type highly unsaturated fatty acid (e.g. a mutant of *Mortierella alpina* SAM1861 (FERM BP-3590)) is cultivated to produce the objective compound or a lipid containing the objective compound. The objective compound such as 6,9-octadienoic acid is separated from the cultivation product. The cultivation is carried out preferably at 20-30°C and pH 6-9. The objective compound can be separated from the lipid e.g. by extracting the cultivated microbial cells with an organic solvent, treating the obtained lipid containing the ω -9 highly unsaturated fatty acid with methanol, extracting the treated liquid with hexane, etc., to obtain a mixture of methyl esters of various fatty acids, separating various ω -type highly unsaturated fatty acid methyl esters from the mixture by low-temperature crystallization, etc., and hydrolyzing the esters.

(54) PRODUCTION OF OIL AND FAT AND MICROORGANISM THEREFOR

- (11) 5-91889 (A) (43) 16.4.1993 (19) JP
 (21) Appl. No. 3-272003 (22) 24.9.1991 (33) JP (31) 91p.216426 (32) 2.8.1991
 (71) SHOWA SANGYO CO LTD (72) TAKASHI YAGI(2)
 (51) Int. Cl.⁵ C12P7/64,C12N1/20/(C12P7/64,C12R1/645)(C12P7/64,C12R1/72)

PURPOSE: To facilitate the extraction process and reduce the cost by cultivating a specific yeast in the presence of a fatty acid (alkyl ester), thereby effecting extracellular production of an oil and fat, especially an oil and fat usable as a substitute for cacao fat.

CONSTITUTION: A microbial strain belonging to the genus *Trichosporon*, *Saccharomycopsis*, *Candida* or *Cryptococcus* and capable of producing an oil and fat out of the microbial cell by the cultivation in the presence of a fatty acid (alkyl ester) (e.g. new microbial strain, *Trichosporon* sp. SH45Y (FERM BP-1236)) is cultivated in a medium containing a fatty acid (alkyl ester), and the produced and accumulated oil and fat is separated from the cultivation liquid. The fatty acid alkyl ester is preferably ethyl palmitate, etc., and the fatty acid is preferably oleic acid, capric acid, etc.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-91889

(43)公開日 平成5年(1993)4月16日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 7/64		8114-4B		
C 1 2 N 1/20	A	7236-4B		
// (C 1 2 P 7/64				
C 1 2 R 1:645)				
(C 1 2 P 7/64				

審査請求 未請求 請求項の数4(全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-272003

(22)出願日 平成3年(1991)9月24日

(31)優先権主張番号 特願平3-216426

(32)優先日 平3(1991)8月2日

(33)優先権主張国 日本(J P)

(71)出願人 000187079

昭和産業株式会社

東京都千代田区内神田2丁目2番1号

(72)発明者 八木 隆

千葉県船橋市日の出2丁目20番2号 昭和
産業株式会社総合研究所内

(72)発明者 中西 泰介

千葉県船橋市日の出2丁目20番2号 昭和
産業株式会社総合研究所内

(72)発明者 波多野 晃子

千葉県船橋市日の出2丁目20番2号 昭和
産業株式会社総合研究所内

(74)代理人 弁理士 坂口 昇造

(54)【発明の名称】 油脂の製造法及びそのための微生物

(57)【要約】

【目的】 油脂、特にカカオ脂の代用となり得る油脂及び／またはパルミトレイン酸含有量の高い油脂を菌体外に発酵生産させる。また植物油製造工程で副生する植物油脂脂肪酸を油脂として回収する有効な手段を提供する。

【構成】 トリコスポロン属、サッカロマイコブシス属、カンディダ属またはクリプトコッカス属に属し脂肪酸アルキルエステルまたは脂肪酸の存在下に培養することにより油脂を菌体外に生産する能力を有する微生物を脂肪酸アルキルエステルまたは脂肪酸を含有する培地に培養して培養液中菌体外に油脂を生成蓄積せしめ、該培養液から生成蓄積した油脂を採取する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 トリコスポロン属、サッカロマイコブシス属、カンディダ属またはクリプトコッカス属に属し、脂肪酸アルキルエステルまたは脂肪酸の存在下に培養することにより油脂を菌体外に生産する能力を有する微生物を脂肪酸アルキルエステルまたは脂肪酸を含有する培地に培養して、培養液中菌体外に油脂を生成蓄積せしめ、該培養液から生成蓄積した油脂を採取することを特徴とする油脂の製造法。

【請求項2】 生産される油脂がカカオ脂様油脂である請求項1の油脂の製造法。

【請求項3】 生産される油脂が構成脂肪酸としてパルミトレイン酸を含有する請求項1の油脂の製造法。

【請求項4】 トリコスポロン・スピーシーズSH45Y（微工研菌寄第12362号）、及びその変異株であるトリコスポロン・スピーシーズSH45Y-E1（微工研菌寄第12363号）及びトリコスポロン・スピーシーズSH45Y-E2（微工研菌寄第12364号）。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は発酵法により菌体外培養液中に油脂を生成蓄積せしめる油脂の製造法に関する。また本発明は上記製造法において油脂がカカオ脂様油脂であるか、または構成脂肪酸としてパルミトレイン酸を高い割合で含有する油脂である油脂の製造法に関する。また本発明は製油副産物の脂肪酸から油脂を製造する方法に関する。また本発明は高い油脂生産能力を有する微生物に関する。

【0002】

【従来の技術】 発酵法による油脂の菌体内製造法としてはオイディウム (Oidium) 属、エンドミセス (Endomyces) 属、カンディダ (Candida) 属、ロドトルラ (Rhodotorula) 属、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属またはロドスポリディウム (Rhodosporidium) 属に属する微生物によるカカオバター代用脂の製造法（特開昭51-123868）； エンドミセス属、ロドトルラ属またはリボミセス

(Lipomyces) 属に属する微生物によるカカオバター代用脂の製造法（特開昭52-122672）； サッカロミセス (Saccharomyces) 属に属する微生物によるパルミトレイン酸含有量の高い脂質成分（トリグリセリドを含む）の製造法（特開昭63-287491）； モルティエラ (Mortierella) 属に属する微生物によるγ-リノレン酸含有量の高い脂質（油脂を含む）の製造法（特開昭59-130191）； 及びクレッケラ (Kloeckera) 属に属する微生物によるパルミトレイン酸含有量の高い脂質（中性脂質を含む）の製造法（特開平1-108991）が知られており、またトリコスポロン (Trychosporon) 属に属する微生物による油脂の製造が報告されている（N. J. Moon et al., J. Am. Oil Chem. Soc., 55, 683-688 (1978) 及び H. Kaneko et al., Li

pids, 11 (No. 12), 837-844 (1976)】。また、サッカロミセス属微生物によるパルミトレイン酸の菌体内製造が知られている（特開昭62-289191）。

【0003】 発酵法による脂質の菌体外製造法としてはカビ類または藻類を界面活性剤の存在下に培養する方法が知られている（特開昭62-3791）。また脂肪酸の菌体外生産能を有するカンディダ・リポリティカ (lypolytica) に属する変異株による脂肪酸の菌体外生産についての報告がある（T. Miyakawa et al., Agric. Biol. Chem., 48, 499 (1984)）。パルミトレイン酸は炭素数16のモノ不飽和脂肪酸の1種であり、ミンク油、マカデミアナッツ油に15~20%含まれている。パルミトレイン酸は有用な薬理作用〔抗腫作用、虫歯抑制作用及び高血圧性疾患における血管障害の防護作用（特開昭62-289191）等〕を有し、またパルミトレイン酸を構成成分とする油脂は皮膚との親和性が良好なため化粧品材料として有用である。カカオ脂はα及びα'位に主として、飽和脂肪酸基を有し、β位に主としてモノエン脂肪酸基であるオレイン酸基を有するトリグリセリドを主成分とする。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 油脂の菌体内生産の場合には、油脂の抽出工程が煩雑である。すなわち、まず菌体を遠心分離または濾過により回収し、ついで湿菌体を破碎し（コロイドミル、ボールミル、ホモジナイザー等による機械的破碎、超音波による破碎等）、n-ヘキサン等で油脂を抽出するか、湿菌体を乾燥し（凍結乾燥、噴霧乾燥等）、クロロホルム：メタノール混合溶媒やn-ヘキサン：イソプロパノール混合溶媒等で油脂を抽出する工程を要する。またカビ類による油脂の生産では、一般に、培養菌体が塊りとなり易く、そのため菌体が攪拌羽根に絡み付いたり、それによって破壊されたり、再現性が十分でないといった問題点が生じやすい。また藻類による油脂の生産では、一般に、培養時間が1週間~1ヵ月と長く、また付帯設備として照射設備を要する。また界面活性剤の存在下での油脂の菌体外生産においては培養終了後、一般に、生成油脂を有機溶媒で抽出するが、この際界面活性剤の存在のため水相と有機溶媒相との分離が十分に行われないという問題が生じやすい。本発明の目的は酵母を用いて油脂を菌体外に発酵生産せしめることにより抽出工程を容易にしコスト低減を図る方法を提供することにある。本発明の別の目的はカビや藻類による油脂生産の問題点を回避できる油脂の菌体外発酵生産法を提供することにある。本発明の別の目的は発酵生産後の油脂の有機溶媒による抽出が、水相と有機溶媒相との分離が容易に行えるという点で、有利に行える油脂の菌体外発酵生産法を提供することにある。本発明のさらなる目的は菌体外にカカオ脂様油脂及び／またはパルミトレイン酸を構成成分とする油脂を発酵生産する方法を提供することにある。本発明のさらなる目的は上記方法を行うに際し有用な、高い油脂生産能力を有する

微生物を提供することにある。本発明のさらなる目的は植物油製造工程で副生する留出油、ソーダ油さい等に含有され、従来有効に利用されていなかった植物油脂肪酸を油脂として回収する手段を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは油脂の菌体外発酵生産を目指して研究を重ねた結果、通常の発酵培地、例えばグルコースを主炭素源とする発酵培地での培養では菌体外油脂生産を示さない特定の属の油脂生産性微生物が、脂肪酸アルキルエステルまたは脂肪酸の存在下での培養によって、油脂を菌体外に著量生成蓄積することを見出し、本発明に到達した。すなわち、本発明はいずれも酵母でトリコスポロン属、サッカロマイコブシス属、カンディダ属またはクリプトコッカス属に属し、脂肪酸アルキルエステルまたは脂肪酸の存在下に培養することにより油脂を菌体外に生産する能力を有する微生物を脂肪酸アルキルエステルまたは脂肪酸を含有する培地に培養して、培養液中菌体外に油脂を生成蓄積せしめ、該培養液から生成蓄積した油脂を採取することを特徴とする油脂の製造法に関する。

【0006】本発明に使用する微生物としては、トリコスポロン属、サッカロマイコブシス属、カンディダ属またはクリプトコッカス属に属し、脂肪酸アルキルエステルまたは脂肪酸の存在下に培養することにより油脂を菌体外に生産する能力を有する微生物であればいずれの微生物でも使用可能である。例えば上記性質を有する微生物の変異株も上記性質を保持する限り本発明で使用可能である。このような変異誘導は通常の変異処理、例えば*

c. 各生理的性質

①ビタミン要求性 (ー) (25℃、4日培養)

ビオチン	リボフラビン	ピリドキシン塩酸塩
イノシトール	葉酸	パントテン酸カルシウム
ニコチン酸	チアミン塩酸塩	p-アミノ安息香酸

②硝酸塩資化性 (ー)

③色素の生成 (ー)

④生育温度 (YM培地、7日培養)

13℃	18℃	23℃	28℃	33℃	37℃
ー	+	++	+++	++	ー

⑤生育pH (25℃、YM培地、10日培養)

3.5	4.0	4.5	6.5	7.5	8.2	9.0	9.5
±	+	++	++	++	+	+	±

【0008】d. 炭素源の同化性と発酵性

試験方法

PSA寒天培地で25℃、4日間培養した生育菌体を滅菌水で1回遠沈洗浄した後、10⁶cells/mlになるよう希*

*紫外線、X線等の照射、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン等の薬剤処理によって行うことができる。使用可能な具体的菌株としては鹿児島市内の土壌から分離されたトリコスポロン・スピーシーズ (Trichosporon sp.) SH45Y (微工研菌寄第12362号)、及びその変異株であるトリコスポロン・スピーシーズSH45Y-E1 (微工研菌第12363号) 及びトリコスポロン・スピーシーズSH45Y-E2 (微工研菌第12364号)、サッカロマイコブシス・リポリティカ (Saccharomycopsis lipolytica) IF0-1659、カンディダ・サイトアナ (Candida saitoana) IF0-0380、カンディダ・トロピカリス (C. tropicalis) IF0-1647、及びクリプトコッカス・アルビダス (Cryptococcus albidus) IF0-1530が挙げられる。

【0007】SH45Y株は次の菌学的性質を有している。

a. 子のう胞子の形成

ゴロドコワ培地、アダムス培地、麦芽培地、V-8培地、ポテト培地及びYM培地で子のう胞子の形成を認めない。

b. 各培地における生育状態 (25℃、4日培養)

①YM液体培地 ー 球～楕円形

2.5 × 2.5、2.5 × 2.5 ~ 3.5 (μ)

②YM寒天培地 ー 球～楕円形

3.5 × 3.5、3.5 × 6 ~ 9 (μ)

偽菌糸形成 (+)

皮膜形成 (ー)

③ポテト抽出液寒天培地 ー 分裂子形成 (+)

※ 釈した。これをイースト・ナイトロジェン・ベース (デیفコ社) に各種炭素源 (糖類) を加えた各試験培地 5 ml (φ18mm試験管) に0.1ml ずつ植菌し、静置培養した。攪拌は1日1回行った。

①炭素源の同化性 (25℃、10~28日培養)

D-グルコース (+)	エタノール (+)
D-ガラクトース (+)	マニトール (+)
マルトース (+)	イノシトール (+)
スクロース (+)	50 D-ソルビトール (+)

ラクトース (+)
 D-ラフィノース (-)
 D-キシロース (+)
 D-アラビノース (+)
 L-アラビノース (+)
 L-ラムノース (+)

②糖類の発酵性 (25℃、7日培養)

D-グルコース (-)
 D-ガラクトース (-)
 スクロース (-)

【0009】以下の菌学的性質をもとにジ・イースツ (The Yeasts) 第3版, N. J. M. Kreger-van Rij 編, Elsevier Science Publishers B. V. 出版(1984)に照らしてSH45Y株をトリコスポロン属に属する菌株と認定した。この菌株は前述の如く工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第12362号として寄託されている。このSH45Y株を常法により変異処理して、後述の実施例に示すごとくSH45Y株よりトリグリセリドの生産性及び/またはパルミトレイン酸の生産性の向上したトリコスポロン・スピーシーズSH45Y-E1及びSH45Y-E2株を得た。これらは前述の如く工業技術院微生物工業技術研究所にそれぞれ微工研菌寄第12363号及び第12364号として寄託されている。

【0010】次に本発明で使用する脂肪酸アルキルエステルについて述べる。脂肪酸アルキルエステルを構成する酸成分としては通常炭素数8~22、特に12~18の飽和・不飽和の脂肪酸、例えばカプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキシン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、エルカ酸が挙げられる。また脂肪酸アルキルエステルのアルコール成分としては通常、炭素数1~6の低級アルコール、例えばメタノール、エタノール、n-プロパノール、i-プロパノール、n-ブタノール等が挙げられるがエタノールが好ましい。脂肪酸アルキルエステルは各単独で用いてもよいし、2種以上組み合わせて用いてもよい。次に本発明で使用する脂肪酸としては通常炭素数8~22、特に16~22の不飽和脂肪酸(例えばパルミトレイン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、エルカ酸)、炭素数8~12の中鎖飽和脂肪酸(例えばカプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸)、または上記不飽和脂肪酸もしくは中鎖飽和脂肪酸と炭素数14~22、特に14~20の長鎖飽和脂肪酸(例えばミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキシン酸、ベヘン酸)との混合物が挙げられる。この不飽和脂肪酸もしくは中鎖飽和脂肪酸と長鎖飽和脂肪酸の混合物中における不飽和脂肪酸もしくは中鎖飽和脂肪酸の割合は10重量%以上、好ましくは25重量%以上である。また、この混合物としては、植物油製造工程で副生する留出油、ソーダ油さい等に含有され、従来有効

グリセロール (+)
 D-マンノース (+)
 D-フラクトース (+)
 可溶性澱粉 (+)
 乳酸ナトリウム (+)
 クエン酸ナトリウム (-)

ラクトース (-)
 マルトース (-)
 D-ラフィノース (-)

に利用されていなかった植物油脂肪酸、例えば大豆脂肪酸、ナタネ脂肪酸を用いることができる。なお、上記のごとく不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸の混合物を使用する場合には、不飽和脂肪酸はもとより飽和脂肪酸も本発明使用酵母によって資化されるが、例えばパルミチン酸またはステアリン酸を単独で用いる場合には、これらは殆ど資化されない。また、脂肪酸と脂肪酸アルキルエステルとを組み合わせ用いてもよいが、その脂肪酸として上記長鎖飽和脂肪酸を用いる場合には、その割合は90重量%未満、好ましくは75重量%未満とする

【0011】本発明で使用する酵母を培養するに際し、培地中に含有せしめる脂肪酸アルキルエステルまたは脂肪酸の量は全体として通常0.1~50g/dl、好ましくは1~10g/dlである。脂肪酸アルキルエステルまたは脂肪酸は培養当初から加えてもよいし、菌がかなり生育した培養中途に加えてもよいし、またその複合した添加型式であってもよい。すなわち培養の全期間に亘って上記濃度が維持される必要はなく、濃度の具体的コントロールは油脂の菌体外蓄積及びその量との関連で適宜決定すればよい。かくして上記濃度範囲での培養により油脂が菌体外に生成蓄積する。また後述する如く、添加する脂肪酸アルキルエステルの脂肪酸または添加する脂肪酸の種類により油脂の構成脂肪酸組成が変化する。

【0012】本発明方法で使用する培地については、油脂の発酵生産に通常使われる培地が使用される。すなわち、実施例に示すごとく、主炭素源のほか窒素源、無機物その他の栄養素を程よく含有する培地ならば、合成培地および天然培地のいずれでも使用可能である。炭素源としては前記脂肪酸アルキルエステルまたは脂肪酸を単独で用いてもよいし、これに少量の例えばこれらの総量に対し20重量%以下の、好ましくは2重量%以下の他の炭素源を加えて用いてもよい。かかる他の炭素源としてはグルコース、スクロース、フラクトース、澱粉、澱粉加水分解物、廃糖蜜など種々の炭水化物、エタノール、メタノール、グリセロール、ポリアルコールなどのアルコール、グルタミン酸、アスパラギン酸などのアミノ酸、n-パラフィンなどの炭化水素などが使用菌の資化性に応じて使用できる。

【0013】窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸ア

ンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素等の無機有機窒素化合物が使用できる。さらに窒素源としてはまたペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーン・スチープ・リカー、カゼイン加水分解物、フィッシュミールもしくはその消化物、脱脂大豆粕もしくはその消化物などの窒素含有天然物も使用できる。無機物としては、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、塩化第一鉄、硫酸マンガン、塩化カルシウム、炭酸カルシウム、硫酸亜鉛、硫酸銅、ホウ酸・モリブデン酸アンモニウム、ヨウ化カリウム等が使用できる。使用する微生物が生育のために特定の栄養素（例えばビオチン、チアミンなどのビタミン等）を必要とする場合は、当然その栄養素を適量培地に加えなければならない。これらの栄養素が窒素源として用いられる窒素含有天然物に含まれて添加される場合はもちろん別に栄養素を添加する必要はない。

【0014】培養は振盪培養あるいは深部攪拌培養など好気的条件下で行う。培養温度は一般には20～35℃が好ましいが、菌が生育する温度であれば他の温度条件でもよい。培養中の培地のpHは、脂肪酸エステルを用いる場合は4.5～6.0、脂肪酸を用いる場合は4.5～7.2に維持することが高収率を得るために望ましい。培養開始後通常3～7日間で菌体外に著量の油脂が生成蓄積する。

【0015】培養終了後、培養液に抽出溶媒を添加して油脂を抽出溶媒中に抽出する。油脂の一部は菌体表面に付着しているので抽出溶媒の添加は、通常、菌体を含む培養終了液そのものまたはその部分濃縮物に対して行う。また上記抽出に加え、菌体内に残存した油脂の回収を常法により行ってもよい。抽出溶媒としては油脂を溶解し、水との混和性がないか乏しい常温で液状の有機溶媒、例えばハロゲン化低級アルカン、例えばクロロホルム、塩化メチレン、四塩化炭素、1,2-ジクロロエタン；n-ヘキサン、エチルエーテル；酢酸エチル；芳香族炭化水素例えばベンゼン、トルエン、キシレン等が好適に用いられる。抽出溶媒の添加量は培養液中に生成蓄積した油脂を十分に回収できる量であればよく特に限定されないが、一般には培養終了液1Lに対し50ml以上、好ましくは100ml～3L、特に好ましくは100ml～1Lである。

【0016】なお、抽出溶媒によって抽出される油脂が菌体外に存在する油脂であることは、①菌体内油脂が抽出される場合に一緒に抽出される、細胞膜を構成しているリン脂質が抽出液中に実質上存在しないこと（対照的に例えば前記特開昭63-287491の実施例1では菌体を破壊することなく乾燥菌体からクロロホルム-メタノール混合物で脂質を抽出しているが、油脂等の単純脂質だけでなくリン脂質等の複合脂質も一緒に抽出されている）、②抽出操作後に完全な（intact）菌体が観察されること、③菌体内生産の場合には通常本法に示すような

単純な操作で油脂が抽出されないこと（例えば従来の技術の項で示した油脂生産に関する先行技術文献参照）等から明らかである。

【0017】抽出溶媒中に抽出された油脂は目的に応じ、抽出溶媒を蒸発除去してそのまま製品とすることもできるし、カラムクロマトグラフィー、蒸留、脱酸等により原料脂肪酸エステルもしくはその分解物である脂肪酸または原料脂肪酸をはじめとする混入成分を除去することによって精製することもでき（脂肪酸エステル及び脂肪酸の除去によりほぼ純粋のトリグリセリドになる）、さらに必要に応じ脱色、脱臭等の処理に付すこともできる。これらの個々の処理操作は油脂の生産に際しての常法（例えば、大豆、とうもろこし、菜種等の植物からの抽出精製に関する宮川高明著、「食用油製造の実際」、幸書房（1988）、発酵生産油脂の精製に関する前出の特開昭63-28491、特開昭52-122672等）及び一般的な発酵生産物の精製方法に準じて行うことができる。

【0018】カカオ脂は α 及び α' 位に主としてステアリン酸残基またはパルミチン酸残基を有し、 β 位に主としてオレイン酸残基を有するトリグリセリドより主として成る。本発明で、原料脂肪酸アルキルまたは脂肪酸として、長鎖飽和脂肪酸（C：16～20）もしくはそのエステルもしくはそれらの混合物を単独で、または長鎖モノ不飽和脂肪酸飽和脂肪酸（C：16～20）もしくはそのエステルもしくはそれらの混合物と組み合わせて使用する場合には、一般にカカオ脂に似た組成を有する油脂、すなわち α 及び α' 位に主として長鎖飽和脂肪酸残基

（C：16～20）を有し、 β 位に主として長鎖モノ不飽和脂肪酸残基（C：16～20）を有するトリグリセリドより主として成る油脂が得られる。ただし、上記で長鎖モノ不飽和脂肪酸もしくはそのエステルもしくはそれらの混合物を併用する場合には、それらの割合は合計で40重量%以下とする。また、長鎖飽和脂肪酸を用いる場合には上記にかかわらず上記の他の成分と併用するものとし、長鎖飽和脂肪酸の使用割合を90重量%未満、好ましくは75重量%未満にするものとする。

【0019】また生成蓄積する油脂の組成は培地に添加する脂肪酸アルキルエステルまたは脂肪酸の種類によって大きな影響を受ける。すなわち、炭素源として飽和脂肪酸アルキルまたは飽和脂肪酸を用いる場合には、一般に、得られる油脂中に占める対応飽和脂肪酸残基及び対応不飽和脂肪酸（主としてモノ不飽和脂肪酸）残基の割合が増加する（後記実施例1～3参照）。また、炭素源として不飽和脂肪酸アルキルまたは不飽和脂肪酸を用いる場合には一般に、得られる油脂中に占める対応不飽和脂肪酸残基の割合が増加する（実施例2及び4参照）。また炭素源として不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸の混合物を用いる場合には、一般に、得られる油脂中に占める対応不飽和脂肪酸残基及び対応飽和脂肪酸残基の割合が増加

する。(実施例5参照)

油脂の生産量は使用菌株によって大幅な差があるが、その生産性は本発明の使用菌中トリコスポロン属に属する菌について特に顕著である(例えば実施例1、2及び4参照)。また、炭素数16の脂肪酸のアルキルエステルを炭素源として用いた場合、本発明のいずれの属の使用菌についても、生成蓄積する油脂中にはパルミトレイン酸残基が含まれるが、その含有量はトリコスポロン属に属する菌についてより多く、トリコスポロン・スピーシーズSH45Y-E2でもっとも顕著であった(実施例1及び2参照)。

【0020】

【実施例】次に本発明方法を実施例により具体的に説明する。

実施例1

下記培地100ml ずつ(下記に示すごとく1.0gのパルミチン酸エチルを含有する)に下記表1に示す酵母をそれぞれ10⁷個接種し、28℃で4日間振盪培養した。培養終了後培養液に15mlのクロロホルムを加え、3回抽出を行った。クロロホルム抽出液は合わせて50mlに定容した。クロロホルム抽出液2mlに内標準物質としてトリヘプタデカノインを1.0mg 加え、濃縮後、TLCに塗布した。n-ヘキサン：ジエチルエーテル：酢酸(80：20：1)で展開しトリグリセリド画分を回収した。トリグリセリド画分に10% KOHメタノール溶液0.6ml を加え、80℃で20分間加熱した。冷却後三フッ化ホウ素-メタノール錯体メタノール溶液を0.7ml 加え、2.5 分間加熱し、冷却*

* 後n-ヘキサン1.0ml を加え、さらに1.5 分間加熱した。再び冷却後塩化ナトリウム飽和水溶液を多量に加え、上層のヘキサン層を回収した。ヘキサン層は無水硫酸ナトリウムで脱水後、ガスクロで脂肪酸を定量した。総脂肪酸量に1.05を乗じ、トリグリセリド量とした。結果を表1に示す。

【0021】培地

NaNO₃ 2.0g、(NH₄)SO₄ 2.0g、K₂HPO₄ 1.0g、KH₂PO₄ 7.0g、MgSO₄・7H₂O 0.3g、CaCl₂・2H₂O 0.1g、NaCl 0.5g、パルミチン酸エチル 10.0g、ビタミン混合水溶液^{*1} 1ml、ミネラル混合水溶液^{*2} 1ml、1%クロラムフェニコール/エタノール 1ml、蒸留水で1000mlにする。

^{*1,2} 下記に示す

ビタミン混合水溶液

ビオチン 2mg、パントテン酸カルシウム 400mg、葉酸 2mg、イノシトール 2000mg、ニコチン酸 400mg、n-アミノ安息香酸 200mg、ピリドキシン塩酸塩 400mg、リボフラビン 200mg、チアミン塩酸塩 400mg、蒸留水で1000mlにする。

ミネラル混合水溶液

Mn SO₄・4~5H₂O 60mg、Zn SO₄・7H₂O、Cu SO₄・5H₂O 40mg、FeCl₂・6H₂O 250mg、H₃BO₃ 60mg、(NH₄)₂MoO₇・4H₂O 25mg、KI 100mg、蒸留水で1000mlにする。

【0022】

【表1】

菌 株	トリグリセリド (mg)	トリグリセリドの脂肪酸組成 (wt%)				
		C ₁₆	C _{16:1}	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}
トリコスポロン・スピーシーズ SH45Y (微工研菌寄第 12362号)	113	63.0	15.9	1.4	16.4	3.3
サッカロマイコプシス・ リポリティカ IF0-1659	53	66.8	8.2	2.5	19.8	2.7
カンディダ・サイトアナ IF0-0380	22	64.0	10.3	1.8	21.0	2.9
カンディダ・トロピカリス IF0-1647	17	61.1	13.4	2.2	21.5	1.8
クリプトコッカス・ アルビダス IF0-1530	10	62.6	9.5	2.0	23.5	2.4
トリコスポロン・スピーシーズ SH45Y-E2 (微工研菌寄第 12364号)	130	62.7	26.7	0.6	6.7	3.2

C₁₆ パルミチン酸、C_{16:1} パルミトレイン酸、C₁₈ ステアリン酸、C_{18:1} オレイン酸、C_{18:2} リノール酸

なお、パルミチン酸エチルに代えグルコース 2g/dlを含有する以外上記と同じ培地を用いて、上記と同様に操作した場合には、いずれの菌株の場合にもトリグリセリド

画分が実質上回収されなかった。

【0023】実施例2

実施例1の培地 100ml、及びパルミチン酸エチルに代え

表2に示す炭素源をそれぞれ含有する実施例1の培地各100ml(表2の炭素源をそれぞれ1.0g含有する)にトリコスポロン・スピーシーズSH45Y-E1(微工研菌寄*

*第12363号)をそれぞれ10⁷個接種し、その後実施例1と同様に操作した。結果を表2に示す。
【表2】

炭 素 源	トリグリセリド(mg)	トリグリセリドの脂肪酸組成 (wt%)					
		C ₁₆	C _{16:1}	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}	
パルミチン酸エチル	174	67.8	19.8	0.7	10.1	1.6	
ステアリン酸エチル	12	1.3	—	65.3	28.0	5.4	
パルミチン酸エチル及び オレイン酸エチル(1:1)	54	50.1	—	2.3	45.0	2.3	

【0024】実施例3

5Lのジャーファーマンタ(ミツワ理化学)にパルミチン酸エチルの含有量が異なる以外実施例1と同じ培地3L(パルミチン酸エチル60gを含む)を入れ滅菌した。パルミチン酸エチルに代えグルコースを含有する以外実施例1と同じ培地200ml(グルコース4.0gを含有する)にトリコスポロン・スピーシーズSH45Y-E1を接種し、28℃で4日間培養した培養液全量を上記ジャーファーマンタ中の培地に接種し、28℃、250rpm、通気量0.5L/minの条件で7日間培養した。培養終了後、培養液にn-ヘキサン(食添用グレード)500mlを加え抽出した。抽出操作は計3回繰り返し、得た抽出液は合せて濃縮した。回収油分はトリグリセリドを精製するため蒸留し ※

※た。KDL1(LEYBOLD社製)を用い0.1mmHg、140℃の条件下で操作を繰り返し、蒸留残物が薄層クロマトグラフィーでトリグリセリドの単一スポットを与えるまで精製した。12.8gのトリグリセリドが得られた。

【0025】トリグリセリドの分析は実施例1に従い総脂肪酸組成を分析した他、2位脂肪酸を分析した。2位脂肪酸はトリグリセリドをパンクレアチンで分解し、薄層クロマトグラフィー(ホウ酸含浸プレート、溶媒系:クロロホルム:アセトン=96:4)で2-モノグリセリドを回収し、以下総脂肪酸と同様に分析した。結果を表3に示す。

【表3】

トリグリ生産量 (g)	脂 肪 酸 組 成 (wt%)					
		C ₁₆	C _{16:1}	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}
12.8	総脂肪酸	63.4	10.4	5.2	18.6	2.4
	2位-脂肪酸	12.2	29.5	1.0	50.3	7.0

表3からモノエン脂肪酸のほとんどが2位に存在し飽和酸が1, 3位に存在していることが明らかである。

【0026】実施例4

下記培地100mlずつ〔下記に示すごとく1.0gの市販オレイン酸(関東化学製、純度76.3%、組成重量% C₁₆ 4.0, C_{16:1} 7.0, C₁₈ 1.3, C_{18:1} 76.3, C_{18:2} 7.4 及びその他4.0)を含有する〕に下記表4に示す酵母をそれぞれ10⁷個接種し、28℃で5日間振盪培養した。

培地

NaNO₃ 2.0g、(NH₄)₂SO₄ 2.0g、K₂HPO₄ 1.0g、KH₂PO₄ ★

★7.0g、MgSO₄・7H₂O 0.3g、CaCl₂・2H₂O 0.1g、NaCl 0.5g、市販オレイン酸10.0g、ビタミン混合水溶液^{*1} 1ml、ミネラル混合水溶液^{*2} 1ml、1%クロラムフェニコール/エタノール 1ml、蒸留水で1000mlにする。

^{*1, 2} 実施例1におけると同様

以後、培養終了液を実施例1と同様に処理した。結果を表4に示す。

【0027】

【表4】

菌 株	トリグリセリド (mg)	トリグリセリドの脂肪酸組成 (wt%)						
		C ₁₆	C _{16:1}	C ₁₈	C _{18:1}	C _{18:2}	その他	
トリコスポロン・ スピーシーズ SH45Y	158 50	2.6	4.1	2.0	81.0	7.6	2.7	

13		14					
サッカロマイコブシス・	32	3.1	5.0	2.5	78.4	7.4	3.6
リポリティカ IFO-1659							
カンディダ・サイトアナ	36	2.8	4.3	2.3	82.1	7.6	0.9
IFO-0380							
カンディダ・トロピカリス	28	2.0	4.4	1.9	80.7	8.0	3.0
IFO-1647							
クリプトコッカス・							
アルピダス IFO-1530	21	3.4	4.8	1.8	77.5	7.9	4.6
トリコスボロン・							
スピーシーズ SH45Y-E1	161	3.2	4.4	1.9	80.5	8.0	2.0
トリコスボロン・	183	3.8	3.9	2.2	80.4	8.4	1.3
スピーシーズ SH45Y-E2							

【0028】実施例5

SLのジャーファーマンタ（ミツワ理化製）にソーダ油さいから回収した大豆脂肪酸（ソーダ油さい（昭和産業製）を酸で中和した後、n-ヘキサン抽出を行いヘキサン層を水で良く洗浄し、n-ヘキサンを留去することによって得られた大豆脂肪酸）〔組成（重量%） C_{16} 10.

5, $C_{16:1}$ ー, C_{18} 4.2, $C_{18:1}$ 23.3, $C_{18:2}$ 53.4 及び

$C_{18:3}$ 8.6) 60g を入れ滅菌した。パルミチン酸エチルに代えグルコースを含有する以外実施例1と同じ培地200ml（グルコース4.0gを含有する）にトリコスボロン・スピーシーズSH45Y-E1を植菌し、28℃で4日間培養した培養液全量を上記ジャーファーマンタ中の培地に植菌*

* し、28℃、250rpm. 通気量0.5L/minの条件で7日間培養した。培養終了後、培養液を実施例3と同様に処理して23.2gのトリグリセリドを得た。このトリグリセリドの総脂肪酸組成は C_{16} 7.0, $C_{16:1}$ ー, C_{18} 4.6, $C_{18:1}$ 24.

7, $C_{18:2}$ 54.8 及び $C_{18:3}$ 8.9であった。

【0029】

20 【発明の効果】本発明方法によれば、前駆体から油脂を菌体外に発酵生産させることができる。また本発明方法によれば前駆体からカカオ脂の代用となり得る油脂を菌体外に発酵生産させることができる。さらに本発明方法によれば前駆体からパルミトレイン酸含量の高い油脂を菌体外に発酵生産させることができる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵

C12R 1:72)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所